

腺病毒包装手册

- 1. 仪器与试剂..... 2
- 2. 腺病毒包装..... 2
 - 2.1. AD293 细胞准备 3
 - 2.2. 腺病毒包装系统转染..... 3
 - 2.3. 腺病毒收集及浓缩 4
 - 2.4. 病毒质量检测 4
 - 2.4.1. 物理指标检测..... 4
 - 2.4.2. 无菌检测 5
 - 2.4.3. 病毒滴度测定..... 5

1. 仪器与试剂

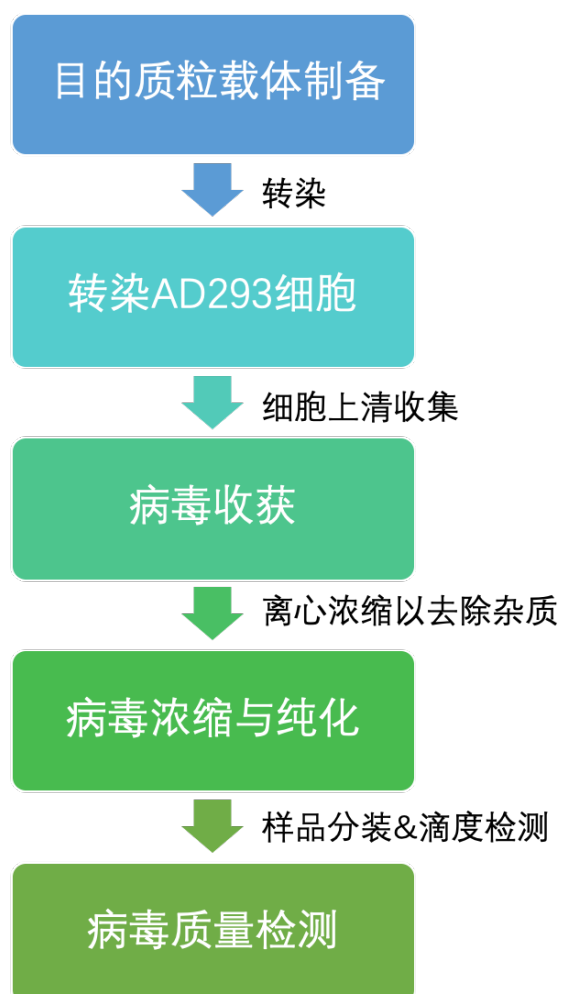
表 1 主要仪器及生产商

仪器名称	生产厂家
Sorvall ST 16R 冷冻离心机	美国 ThermoFisher 公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
生物安全柜	新加坡 ESCO 公司
EVOS 荧光显微成像系统	美国 ThermoFisher 公司
恒温二氧化碳细胞培养箱	德国 Binder 公司
实验室耗材 I (移液枪头、1.5/2.0 mL 离心管)	美国 Axygen 公司
实验室耗材 II (细胞培养皿、移液管等)	美国 Corning 公司
超低温冷冻冰箱	美国 ThermoFisher 公司
凝胶成像分析系统	北京赛智创业科技有限公司
凝胶电泳系统	美国 BioRad 公司

表 2 主要试剂及生产商

试剂名称	生产厂家
腺病毒包装试剂盒	北京合生基因科技有限公司
EpFect Transfection Reagent	北京合生基因科技有限公司
EvaGreen 2× Master Mix	北京合生基因科技有限公司
DMEM 高糖培养基	美国 Gibco 公司
RPMI 1640 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司

2. 腺病毒包装



2.1. AD293 细胞准备

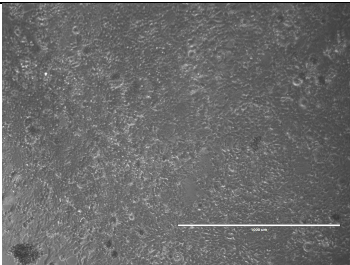
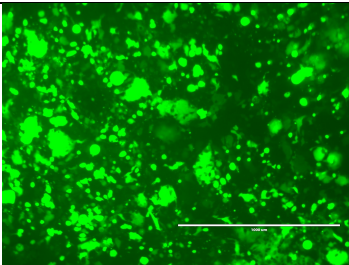
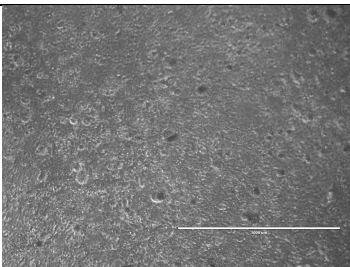
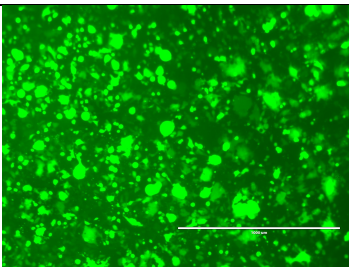
将 $3\sim5\times10^6$ 个 AD293 细胞传代接种至 100 mm 细胞培养皿中，置于 37 °C，5% CO₂ 的培养箱中，培养 16 h~24 h。传代过程中需要将细胞充分消化为单细胞悬液，以获得较好的包装效果。

2.2. 腺病毒包装系统转染

- 1) 将腺病毒骨架质粒线性化转染 AD293 细胞
- 2) 观察感染 72h 荧光表达情况。

腺病毒包装过程中荧光表达情况示例

载体编号	白光	绿色荧光
------	----	------

目的		
对照		

2.3.腺病毒收集及浓缩

- 1) 7-10 天时观察 AD 293 细胞状态及出毒效率，将上清及细胞全部收集置于-80℃反复冻融 3 次；
- 2) 将冻融后的病毒悬液依次接种三次，接种量做梯度处理，分别收集 3-5 天细胞病变完全的感染组，置于-80℃反复冻融 3 次；
- 3) 用适量腺病毒悬液感染 AD 293 15 cm 培养皿，3-5 天待细胞病变完全收集病毒悬液置于-80℃反复冻融 3 次；
- 4) 5000 rpm 离心 10 min，弃细胞碎片，收集上清加 PEG 8000 浓缩过夜。12000 rpm 离心上述混合物 20 min，弃上清，将沉淀物悬浮在密度为 1.10 g / mL CsCl 溶液中；
- 5) CsCl 密度梯度离心，2,0000 rpm 离心 3h，收集密度在 1.30g / mL 和 1.40g / mL 之间的病毒于透析袋中，在透析缓冲液中 4℃过夜，中间换一次透析液。收集病毒，测定病毒滴度；

2.4.病毒质量检测

腺病毒的质量控制要点包括物理状态检测、无菌检测及病毒滴度检测。

2.4.1. 物理指标检测

- 1) 颜色判定：通过肉眼判定，腺病毒保存液呈澄清液体状。

- 2) 粘稠度判定：用 20-200 μL 规格移液器缓慢吸取 50 μL 腺病毒保存液体，无明显粘稠感或吸液滞后现象；

2.4.2. 无菌检测

将病毒加入 293 细胞验证，正常培养 24 h 后镜检，无任何细菌及真菌污染情况，同时参照空细胞组，细胞间隙无明显颗粒存在，培养基澄清透明。

2.4.3. 病毒滴度测定

- 1) 选取状态良好的 AD 293 细胞，使用完全培养及重悬细胞，制备成 2.5×10^5 个 / mL 的细胞悬液，24 孔板每个孔中接种 1mL 细胞， 37°C 、5% CO_2 培养 1 小时。
- 2) 准备好 10 倍梯度稀释的病毒样品，每孔空逐滴加入 30 μL 病毒样品。
- 3) 37°C 、5% CO_2 培养 2 天。
- 4) 轻轻去除培养液，将 24 孔板侧壁缓慢加入预冷的甲醇 0.5mL， -20°C 固定 10 min。
- 5) 使用 500 μL 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 6) 使用含 10% BSA 的 PBS 稀释 1000 \times anti-Hexon 抗体，每孔中添加 250 μL ， -37°C 孵育 1 小时。
- 7) 使用 500 μL 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 8) 使用含 10% BSA 的 PBS 稀释 500 \times 辣根过氧化物酶标记的二抗，每孔中添加 250 μL ， -37°C 孵育 1 小时。
- 9) 使用 500 μL 含 10%BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次(切记将细胞冲起)。
- 10) 加入 250 μL 新配置的 1 \times DAB 工作液至每孔，室温孵育 10 min。
- 11) 弃去 DAB，使用使用 1ml 含 10% BSA 的 PBS 轻轻冲洗细胞。
- 12) 每孔随机选择 5 个视野，使用光学显微镜 10 \times 物镜下计算阳性细胞个数。
- 13) 计算没孔阳性细胞的平均个数和病毒滴度。

14) 计算显微镜下视野中阳性细胞的平均个数。选择一个梯度，此梯度视野中有 5-50 个阳性细胞，随机选择至少 5 个区域计数。

15) 计算 24 孔板中每孔视野的个数。对于多数显微镜 标准 10×目镜与 10×物镜所观察到的视野直径为 1.8mm，因此每个视野的面积= $3.14 \times (D/2)^2 = 3.14 \times 0.92 = 2.54 \text{ mm}^2$ 。

16) 对于一个标准 24 孔板，培养面积为 2.0 cm^2 ，因此每孔视野数= $2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \text{ mm}^2 = 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 = 79$ ，如果您不能确定您的物镜所观察到的视野直径或者您使用的不是 10×物镜，视野直径可用血球计数板来确定。

17) 滴度计算式

$$\text{Viral Titer} = \frac{(\text{average positive cells / field}) \times (79 \text{ fields / well}) \times \text{dilution factor}}{(0.03\text{mL})}$$

18) 本次实验在显微镜下 5 个视野中计算的阳性细胞平均数为 6.6，此孔病毒稀释了 10^6 倍，根据以上公式得出：

$$\text{病毒滴度} = \frac{6.6 \times 79 \times 10^6}{0.03} = 1.73 \times 10^{10} \text{ IFU/mL}$$